

Title	Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue(Abstract_要旨)
Author(s)	Sakaguchi, Hideya
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2016-03-23
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k19568
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	坂 口 秀 哉
論文題目	Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue （ヒト胚性幹細胞由来の背内側終脳領域からの機能的な海馬神経細胞の生成）		
（論文内容の要旨）			
<p>記憶や学習に深く関与するとされる海馬は、大脳の背内側領域に形成される。近年、多能性幹細胞を用いた神経外胚葉組織の誘導技術の発展により、ヒト胚性幹細胞(ES 細胞)から、層構造を持った大脳新皮質や神経網膜を含む眼杯など、様々な神経組織を 3 次元下に誘導する事が可能になってきた。しかし、海馬組織やその前駆体にあたる medial pallium の多能性幹細胞からの誘導は、これまでどの動物腫においても十分に行われていなかった。本研究では、ヒト ES 細胞を用いて、大脳の中で海馬神経細胞を産生する medial pallium を含む背内側終脳領域(dorsomedial telencephalic tissue)の誘導技術を確立することを目的とした。</p> <p>まず、過去に報告した大脳新皮質領域の 3 次元での誘導方法を元に、最背内側終脳領域である脈絡叢を 3 次元で効率よく誘導する条件を検討した。大脳新皮質組織の誘導条件に背側化因子である BMP4 蛋白と、Wnt agonist である CHIR99021 を継続的に添加する事で、脈絡叢組織を 3 次元下に誘導する事ができた。次に背側化因子の添加期間を短くする事で、背内側終脳に存在する脈絡叢・cortical hem・medial pallium を生体と同じパターンニングを保って 3 次元下に誘導する条件を見出した。ここでは、誘導された脈絡叢や cortical hem に相当する組織が生体と同じように Wnt や BMP 蛋白を産生している事が qPCR で確認され、一時的な背側化因子の添加によって背側化を促す organizer を誘導する事で、海馬領域を含む medial pallium 様の組織が細胞凝集塊内で自己組織的に誘導されるに至ったと考えられた。次に、得られた medial pallium 組織を長期培養することによって、day60 日以降では海馬マーカーである Zbtb20 陽性の神経細胞が産生されることを確認した。得られた細胞凝集塊を day73-84 から分散培養することで、100 日以上 of 長期培養が可能となった。産生された Zbtb20 陽性細胞は小さな凝集塊を形成し、それぞれ MAP2 陽性の神経突起で結合していた。海馬マーカー発現の評価を行った結果、歯状回顆粒細胞マーカーである Prox1 陽性の細胞と、CA3 領域に認める KA1 陽性の細胞が得られた細胞集団に含まれており、それぞれ海馬歯状回の顆粒細胞と、CA3 の錐体細胞に相当すると考えられた。得られた細胞は成熟マーカーである CaMK2 の発現を認め、電気生理にて活動性を認めた。最後に、ネットワークとしての神経活動を評価するため、カルシウムインジケーターを用いて細胞内カルシウム動態を live imaging で評価した。個々の神経はそれぞれの神経で異なる自発的なカルシウム発火のパターンを認めており、これらの活動は Na チャネルブロッカーであるテトロドトキシンの添加で抑えられることから、神経活動を反映していると考えられた。活動性の神経の割合は、分散後 4 週に比べて分散後 8 週の方が著しく上昇しており、時間依存性の活動促進が考えられた。分散後 8 週では同期発火を認め、これはシナプス形成や神経回路形成の進展の過程を反映していると考えられた。本研究は複雑な発生過程をもつ海馬組織をヒト ES 細胞から誘導した事により、ヒトの海馬発生や海馬関連疾患の研究に有用であると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)			
<p>多能性幹細胞を用いた神経外胚葉組織の誘導技術を用いて、大脳新皮質や神経網膜を含む眼杯など、様々な神経組織を誘導する事が可能になってきたが、海馬組織やその前駆体にあたる medial pallium の多能性幹細胞からの誘導は、これまで十分に行われていなかった。本研究で、まず報告者らはヒト胚性幹細胞を用いて最背内側終脳領域である脈絡叢を 3 次元で効率よく誘導する条件を検討し、大脳新皮質組織の誘導条件に背側化因子である BMP4 蛋白と、Wnt シグナルを増強する CHIR99021 を継続的に添加する事で、脈絡叢組織を 3 次元下に誘導する事に成功した。次に背側化因子の添加期間を短くする事で、背内側終脳に存在する脈絡叢・cortical hem・medial pallium を生体と同じパターンニングを保って 3 次元下に誘導する条件を確立している。得られた組織を長期培養することによって、day60 以降では海馬マーカーである Zbtb20 陽性の神経細胞が産生されることを確認し、さらに得られた細胞凝集塊を day73-84 から分散培養することで、海馬歯状回顆粒細胞と、CA3 錐体細胞に相当すると考えられる細胞を誘導した。カルシウムインジケーターを用いた細胞内カルシウム動態の live imaging では、分散後 8 週では同期発火を認め、これはシナプス形成や神経回路形成の進展の過程を反映していると考えられた。以上の研究は複雑な発生過程をもつ海馬組織のヒト ES 細胞からの誘導の解明に貢献し、ヒトの海馬発生や海馬関連疾患の研究に寄与する所が多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 1 月 14 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			